

Estrogeenireseptorit laajentuneessa nousevassa aortassa

Nitta-Nea Lätti

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen Yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Patologian tutkimusryhmä

Lokakuu 2016

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Nitta-Nea Lätti: Estrogeenireseptorit laajentuneessa nousevassa aortassa

Kirjallinen työ, 10 s.

Ohjaajat: prof. Timo Paavonen, dosentti Ari Mennander

Lokakuu 2016

Avainsanat: aortta, aneyrysmä, estrogeeni, sukupuoli,

Tiivistelmä.

Yleisimmät riskitekijät rinta-aortan laajentumiselle ovat korkea verenpaine, eräät sidekudostaudit, tupakointi ja aorttaläppävuoto. Naissukupuolen ja estrogeenin on epäilty suojelevan rinta-aortan laajentumiselta. Tämän syventävien työn tavoite oli saada lisätietoa estrogeenireseptorien tehtävistä ja esiintyvyydestä laajentuneessa nousevassa aortassa.

Kolmenkymmenen leikatun potilaan laajentuneen nousevan aortan seinämänäytteestä tutkittiin immunohistokemiallisella menetelmällä estrogeenireseptoriposiitivisuus. Kaikki tutkimuksen potilaan oltiin leikattu TAYS:sin Sydänsairaalassa.

Tämän työn perusteella estrogeenireseptorien positiivisuus ei ole yhteydessä aortan degeneraatioasteeseen. Nousevan aortan laajentuminen ei näytä korreloivan degeneraatioasteeseen, joka olisi yhteydessä estrogeenireseptoreihin. Tutkimus antaa arvokasta viitettä siitä, että nousevan aortan degeneraatio voisi myös olla aorttakudosta stabiloiva ominaisuus.

Sisällys

JOHDANTO.....	1
TUTKIMUKSEN TAUSTAA	1
TUTKIMUSMENETELMÄT.....	3
TULOKSET	4
POHDINTA	9
Lähteet.....	11

JOHDANTO

Yleisimmät riskitekijät rinta-aortan laajentumiselle ovat korkea verenpaine, eräät sidekudostaudit, tupakointi ja aorttaläppävuoto. Naissukupuolen ja estrogeenin on epäilty suojelevan rinta-aortan laajentumiselta. Aortan laajentuminen on harvinaista naisilla ennen vaihdevuotia. Nousevan aortan laajentuminen lisää aortan repeämiskä. Vaihdevuodet ohittaneilla naisilla on suurempi riski aortan repeämiseen verrattuna saman ikäisiin miehiin. Naisilla repeämisen riski on lisäksi suurempi pienemmällä aortan läpimitoilla kuin miehillä (1).

Nousevan aortan laajentuminen voi johtaa dissekatioon eli aortan seinämän pitkittäiseen repeämiseen. Toisaalta nousevan aortan laajentumiseen liittyy aortan seinämän degeneraatio. Aortan repeämään liittyy huomattavat kustannukset sekä korkea kuolleisuus. Vuonna 2012 Suomessa tehtiin noin 400 rinta-aortan leikkausta, joista aiheutui 2 800 erikoissairaanhoidon hoitopäivää (2). Ateroskleroosin vähäisyys nousevassa aortassa viittaa siihen, että aortan dissekatio voi liittyä erilaiseen aortan seinämän molekulaariseen mekanismiin kuin pelkkä nousevan aortan laajentuminen (AA) (3). Tämän tutkimuksen tavoite on saada lisätietoa estrogeenireseptorien tehtävistä sekä ER-alfan ja ER-betan esiintyvyydestä laajentuneessa nousevassa aortassa. Tämä syventävien työ on osa laajaa monivuotista nousevan aortan tutkimusta Tampereella. Tutkimukselle on saatu tutkimuslupa Valviralta.

TUTKIMUKSEN TAUSTAA

Estrogeenit vaikuttavat estrogeenireseptorien kautta. Estrogeenireseptorit (ER) ovat osa steroidihormonireseptoreiden ryhmää. Estrogeenireseptoreita tiedetään olevan ainakin kolmea alatyyppeä: ER-alfa, ER-beta sekä ER-gamma. Estrogeenireseptoreita on tutkittu paljon jyrkänäytteillä, joissa eri estrogeenireseptorien jakautuminen verisuonistossa vaihtelee

huomattavasti. Eri estrogeenireseptorien esiintyvyyteen vaikuttavat verisuoniston kohtaama rasitus sekä vauriot. (4) Eri estrogeenireseptorit vastaavat ilmeisimmin eri tehtävistä (4,5,6,7).

Lindrer V. kollegoineen tutki estrogeenireseptorien toimintaa verisuonivauriossa vuonna 1998. Tutkimuksessa käytettiin ER-alfa-knockouthiiriä, joilta oli poistettu munasarjat. Uroshiirten verisuonia vaurioitettiin pallolaajennuksella, jolloin ER-beta reseptoreita ilmentyi voimakkaasti endoteeli- ja sileälihassoluissa. Määrä oli huipussaan 1 -2 päivän päästä vauriosta ja pysyi korkealla tasolla 8-14 vuorokautta. 28 päivän kohdalla ER-betan määrä palautui lähtötasoon (5).

Estrogeenien tarkka vaikutusmekanismi verisuonistossa ei ole tiedossa. Estrogeeni (17-beta-estradioli) vähentää IGF-1- reseptorin esiintyvyyttä sekä IGF-1- välittäjäaineen tuotantoa rotan aortan sileissä lihaksissa. IGF-1- välittäjäaineen ja IGF-1-reseptoreiden on osoitettu olevan koholla ateroskleroottisissa leesioissa (5). Estrogeeni lisää typpioksidituotantoa verisuonien endoteelissa, joka vähentää inflammaatiota ja ateroskleroosin esiintyvyyttä. Sekä ER-alfa että ER-beta lisäävät endoteelin typpioksidisyntaasin määrää, mutta vain ER-beta pystyy aktivoimaan typpioksidisyntaasin fosforylaation kautta (8). ER-betan aktivaatio vähentävät sileissä lihasoluissa proinflammatoristen välittäjäaineiden määrää ja neutrofiilien migraatiota rottien kaulavaltimoissa. Vaikutuksen epäillään välittyvän TNF-alfa- välittäjäaineen kautta (4). Tutkimuksen kohteena ovat olleet myös MMP-2 ja MMP9 (9).

Nakamura Y. kollegoineen tutki vuonna 2004 ER-alfan ja ER-beta mRNA:ta humanaiaorttanäyteistä. Estrogeenireseptoreiden määrä oli huomattavasti suurempi naisten terveissä aortoissa verrattuna valtimokovettumaa sisältäviin sairaisiin aorttoihin. ER-alfa inhiboi sileiden lihassolujen proliferaatiota varsinkin pre-menopausaalisilla naisilla (10). Viime vuosina verisuonien vaso vasorum- verisuonet ovat herättäneet mielenkiintoa. Aortta on runsaasti verisuonitettu ja suurin osa aortan verisuonista sijaitsee adventitiassa sekä median ja adventitian rajalla. Median ja adventitian rajalla on runsaasti löyhää sidekudosta ja kapillaareja, mikä tekee rakenteesta hauraan ja se voi repeytyä korkean verenpaineen seurauksena (11). Estrogeenireseptorit osallistuvat uudissuonien muodostukseen ja saattavat säädellä näiden kapillaarien kehittymistä (12).

Tutkimuksen tarkoitus on selvittää, onko estrogeenireseptorien määrä ja laatu yhteydessä nousevan aortan laajentumiseen suhteessa aortan seinämän degeneraatioon.

TUTKIMUSMENETELMÄT

Tutkimukseen otetaan kolmekymmentä kudospäytettä kolmestakymmenestä laajentuneesta nousevasta aortasta. Näytteet ovat potilailta, jotka on leikattu TAYS:sin Sydänsairaalassa vuosina 2007-2013. Näytteissä on tunnistetietoina numerosarjat, jotka paljastavat vain leikkausvuoden. Näytteiden valmistaja ja analysoija ei tiedä potilaiden sukupuolta, ikää tai leikkaukseen johtanutta syytä.

Jokaisesta näytteestä otetaan kaksi erillistä 4 mikrometrin leikettä, joista toinen värjätään ER-alpha 1:50 värjäyksellä ja toinen leike ER-beta CC1 1:50 värjäyksellä. Näytteet luokitellaan siten, että jokaiselle näytteelle tulee luokitusaste nolla ja kolmen väliltä värjäyspositiivisuuden mukaan (kts. taulukko 1.) Aortan histologiset kerrokset, intima, media ja adventitia, analysoidaan erikseen. Värjäyspositiivisuus katsotaan endoteelisoluista. Endoteelisolukkoa on vasa vasorum-suonissa sekä aortan intimassa. Media-kerroksesta analysoidaan myös sileälihassolut.

Taulukko 1: Luokitteluperusteet.

Luokitusaste	Värjäyspositiivisuus
0	Ei värjäyspositiivisuutta
1	Alle 1/3 endoteelisoluista/ sileälihassoluista
2	Alle 2/3 endoteelisoluista/ sileälihassoluista
3	Yli 2/3 endoteelisoluista/ sileälihasoluista

Näytteiden analysoinnin jälkeen tuloksia verrataan näytteiden degeneraatioon. Aikaisempi tutkimusryhmä on luokitellut näytteet asteisiin 0,1, 2 ja 3 myksomatoottisen degeneraation (myox) ja elastisen degeneraation (elast) suhteen. Tilastolliset analyysit tehtiin SSPS-ohjelmalla käyttäen Mann-Whitney- menetelmää.

TULOKSET

Tulokset on esitetty taulukoissa 2, 3 ja 4.

Taulukko 2. : ER-beta tulokset. NA= ei analysoitavissa.

Näyte	Intima: endoteeli	media: endoteeli	media: muut solut	adventitia: endoteeli
1	0	1	0	3
2	1	1	0	2
3	1	2	0	3
4	0	2	0	3
5	0	0	0	2
6	0	0	1	2
7	0	0	1	1
8	1	3	3	3
9	0	0	0	2
10	0	0	0	1
11	2	0	0	1-2
12	0	1-2	0	1
13	1	0	0	1
14	0	0	0	0
15	2	1	2	2
16	1	0	0	2-3

17	0	2	1	1-2
18	1	1	0	2
19	1	1	0	3
20	1	0	0	NA
21	0	0	0	1
22	0	1	0	2
23	1	1	0	1
24	NA	0	0	3
25	1	0-1	0	3
26	1	1-2	0	0-1
27	1	1	0	2
28	2	1	0	3
29	1	NA	0	2
30	2	2	0	1-2

Taulukko 3. ER-alfa tulokset. NA= ei analysoitavissa.

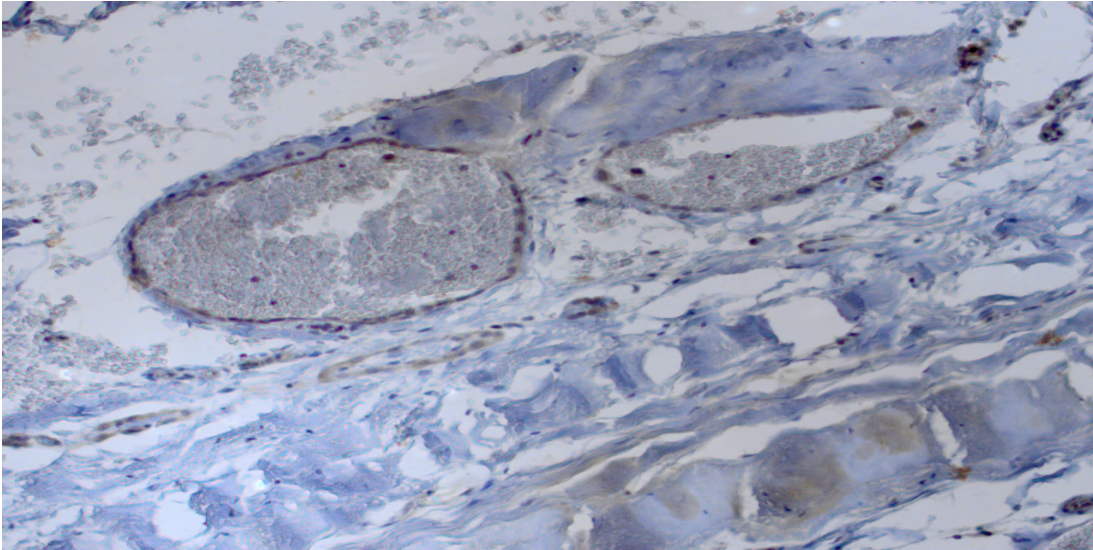
Näyte	Intima: endoteeli	media: endoteeli	media: muut solut	adventitia: endoteeli
1	0	0	0	0
2	0	0	0	1
3	0	0	0	0
4	0	0	0	1
5	0		0	1
6	0	0	0	1-2
7	0	0-1	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0

11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	1	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	NA
25	0	0	0	0-1
26	NA	NA	0	NA
27	NA	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0		0	0
30	0	0	0	1

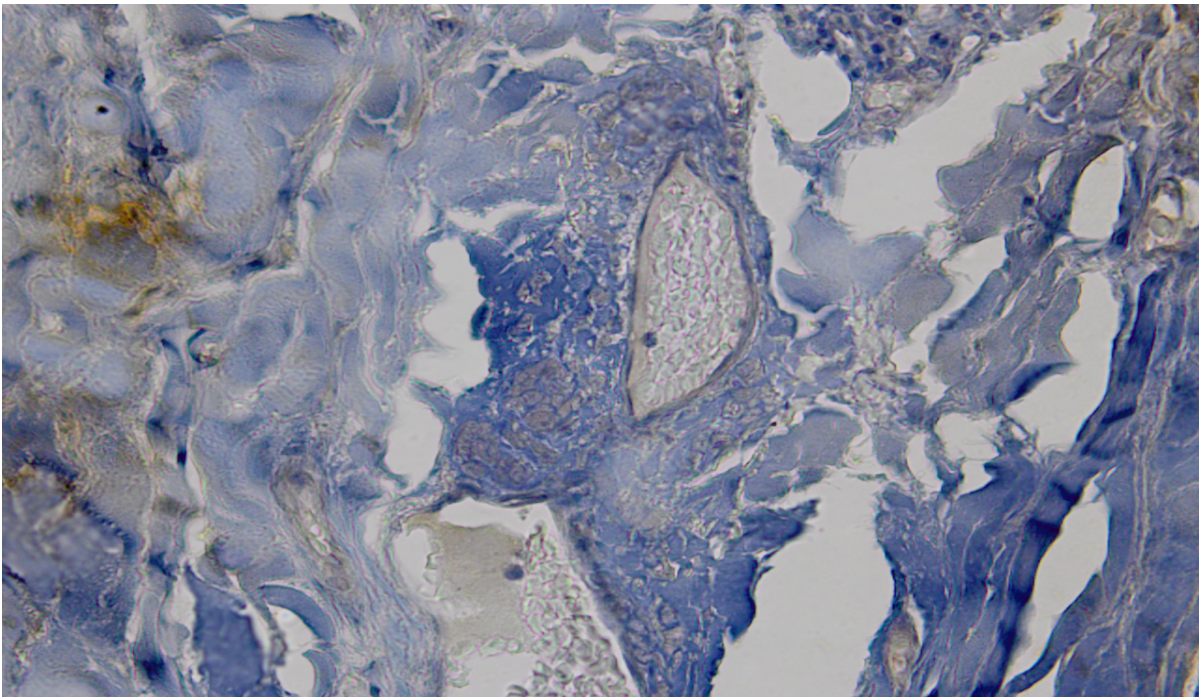
Taulukko 3: Näytteiden degeneraation aste, ikä leikkausvuonna ja sukupuoli.

Näyte	ELAS	MYOX	Sukupuoli	ikä leikkausvuonna
1	1	0	mies	59
2	3	3	nainen	72
3	1	3	mies	62
4	3	3	nainen	74
5	2	1	mies	70
6	1	0	nainen	68

7	1	3	mies	61
8	3	3	mies	68
9	2	0	mies	51
10	3	3	mies	63
11	0	0	mies	51
12	2	3	nainen	75
13	0	1	mies	77
14	2	0	nainen	71
15	1	2	nainen	33
16	0	1	nainen	75
17	1	1	mies	63
18	2	2	nainen	63
19	0	2	mies	63
20	1	3	mies	65
21	1	1	mies	67
22	3	2	nainen	77
23	2	1	mies	72
24	2	2	mies	72
25	0	1	mies	65
26	1	2	nainen	74
27	0	2	nainen	72
28	3	2	mies	50
29	1	1	mies	64
30	3	3	nainen	72



Kuva 1: Esimerkinäyte ER-beta, luokitusaste 3. 40 x suurennos.



Kuva 2: Esimerkinäyte ER-beta, luokitusaste 1. 40 x suurennos.

ER-alpha ja ER-betan esiintymisellä ei ollut korrelaatiota näytteiden degeneraatiomuutosten, sukupuolen tai potilaan iän kanssa.

POHDINTA

Tämän työn perusteella ER-alfa ja ER-beta positiivisuus ei ole yhteydessä aortan degeneraatioasteeseen. Potilaan ikä tai sukupuoli eivät vaikuttaneet tuloksiin. Toistaiseksi ei ole todisteita siitä, miten ikä vaikuttaa estrogeenireseptoreiden määrään. Tiedetään, että estrogeenien määrä vähenee menopausin jälkeen. Onko mahdollista, että estrogeenireseptorien määrä kompensatorisesti nousisi terveessä aortassa vai väheneekö reseptoreiden määrä estrogeenituotannon mukana?

Nousevan aortan laajentuminen heijastaa aortan seinämän degeneraatiota. Heikentynyt aortan seinämä on altis repeytymään, kun aortan läpimitta on yli 5 cm. Myksomatoottista ja elastiinista degeneraatiota käytetään luokittelemaan aorttanäytteiden degeneraation astetta. Näytteiden myksomatoottisella degeneraatiolla ja elastiinisella degeneraatiolla ei ollut korrelaatiota ER-alfa ja ER-beta positiivisuuteen. Toisaalta nousevan aortan dissekaatio eli pitkittäissuuntainen repeytyminen voi esiintyä alle 5 cm laajentuneissa aortoissa. Tässä työssä ei oltu eroteltu näytteitä, joissa on kliinisesti tapahtunut dissekaatio.

Estrogeenireseptoreita on todettu verisuonten seinämissä (10). Tässä työssä lähes kaikki näytteet olivat ER-alfa-negatiivisia (taulukko 3), kun taas lähes kaikki näytteet olivat ER-beta-positiivisia (taulukko 2). Tämä eroaa huomattavasti Nagamuran kollegoineen tehneessä tutkimuksesta. Toki Nakamura kollegoineen tutki sekä ER-alfa- sekä ER-beta-reseptoreiden mRNA:ta eivätkä reseptoreita. (10) Nakamuran ja kumppaneiden tutkimuksesta voi kuitenkin päätellä sen, että humanaiaortoissa tulisi olla ER-alfa-reseptoreita.

Suurin osa ER-beta-reseptoreista sijaitsi adventitiassa sijaisevissa kapillaareissa. On viitteitä siitä, että aortan degeneraatio saisi alkunsa adventitiasta (11, 12). Laadullisesti heikentyneen vaso varosum- verenkierron voisi ajatella huonontavan kudoksen uudistumiskykyä, joka edistäisi aorttasairauden etenemistä. Estrogeeni saattaa suojata aortan seinämää degeneraatiolta, sillä

estrogeenien epäillään osallistuvan uudissuonten muodostumiseen (12). Tämän teorian pohjalta voisi ajatella, että estrogeenireseptorit lisääntyisivät vaurioituneessa aortassa.

Tämän työn tuloksia verrataan muihin samassa tutkimusryhmässä tehtyihin tuloksiin sekä potilasaineiston kliinisiin tietoihin. Meidän työssämme kaikki tutkitut nousevan aortan näytteet olivat sairaita. On huomattavaa, ettei aortan seinämän degeneraatioaste korreloi aortan seinämän laajentumisasteeseen ja näin ollen estrogeenireseptoreiden määrään. On mahdollista, että sairaissa nousevissa aortoissa estrogeenit eivät enää vaikuta ja geenien toiminta on häiriintynyt siten, että uusia estrogeenireseptoreita ei enää muodostu. Tulevaisuudessa tulisi selvittää nousevan aortan laajentumaan ja dissekaatioon johtavan tapahtumaketjun alulle paneva tekijä.

Lähteet

1. Grootenboer N., Bosch J.L, Hendriks J.M, van Sambeek M.R.H.M. Epidemiology, Aetiology, Risk of Rupture and Treatment of Abdominal Aortic Aneurysm: Does Sex Matter?. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009; 38: 278-284.
2. Terveiden ja hyvinvoinninlaitos. 2014. Suomen virallinen tilasto, Terveys 2013. <http://thl.fi/fi/tilastot/tilastot-aiheittain/erikoissairaanhoidon-palvelut/somaattinen-erikoissairaanhoido.fi>. Luettu 28.1.2016.
3. 7.Gillum RF. Epidemiology of aortic aneurysms in United States. *J Clin Epidemiol* 1995;48(11): 1289-1298.
4. 2.Andersson C., Lydrup ML., Ferno M., Idvall I. ym. Immunocytochemical demonstration of oestrogen receptor beta in blood vessels of the female rat. *Journal of Endocrinology* 2001; 169(2):241-247.
5. 3.Lindner V. Kim SK. Karas RH. Kuiper GG. ym. Increased expression of estrogen receptor-beta mRNA in male blood vessels after vascular injury. *Circulation Research* 1998; 83(2):224-229.
6. 4.Barchiesi F. Jackson EK. Imthurn B. Fingerle J. ym. Differential regulation of estrogen receptor subtypes alpha and beta in human aortic smooth muscle cells by oligonucleotides and estradiol. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004;89(5):2373-2381.
7. 5.O'Lone R. Knorr K. Jaffe IZ. Schaffer ME. yms. Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Molecular Endocrinology* 2007;21(6):1281-1296.
8. Chakrabarti S. Lekontseva O. Peters A. Davidge ST. 17beta-Estradiol induces protein S-nitrosylation in the endothelium. *Cardiovascular Research* 2010; 85(4):796-805.
9. 8. Xiao-Fei Wu, M.D.^a, Jian Zhang, M.D.^b, Saulius Paskauskas, M.D.^c, Shi-Jie Xin, M.D. ym. The role of estrogen in the formation of experimental abdominal aortic aneurysm. *The American Journal of Surgery* 2009; 197(1):49-54.
10. 6.Nakamura Y. Suzuki T. Miki Y. Tazawa C. ym. Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. *Molecular Endocrinology* 2007; 21(6):1281-1296.
11. Osada H et al. Aortic dissection in the outer third...*Eur J Cardio-Thorac Surg* 2013;43:e82-e88.
12. Albrecht ED, Babischkin JS, Lidor Y, et al. Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells. *Hum Reprod* 2003; 18: 2039–2047.